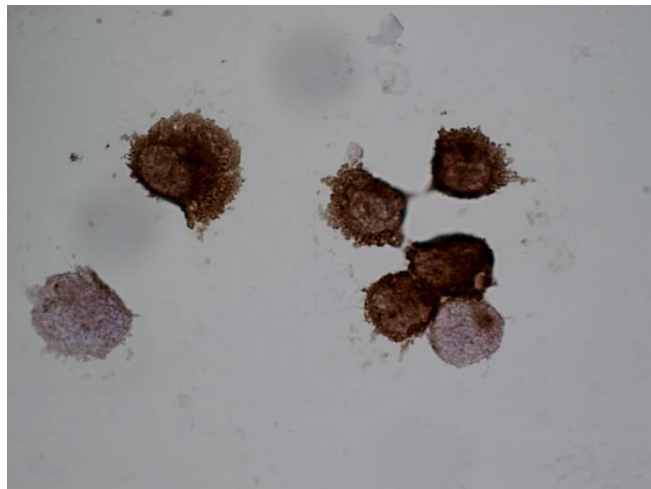


# Detektion av CD163-positiva celler i ledkapsel och ledvätska från häst

*Caroline Linderholt*



*Uppsala  
2015*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2016:23*



# Detektion av CD163-positiva celler i ledkapsel och ledvätska från häst

## Detection of CD163-positive cells in joint capsule and synovial fluid from horses

*Caroline Linderholt*

**Handledare:** Cecilia Ley, Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap

**Biträdande handledare:** Maria Löfgren, Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap

**Biträdande handledare:** Stina Ekman, Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap

**Biträdande handledare:** Inger Lilliehöök, Institutionen för Kliniska Vetenskaper

**Examinator:** Caroline Fossum, Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0751

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2015

**Delnummer i serie:** Examensarbete 2016:23

**ISSN:** 1652-8697

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** CD163, osteoartrit, makrofag, M2 makrofag, synovit, biomarkör, ledkapsel, cytospin, immunocyto kemi, immunohistokemi, häst

**Key words:** CD163, osteoarthritis, macrophage, M2 macrophage, synovitis, biomarker, joint capsule, cytospin, immunocytochemistry, immunohistochemistry, equine, horse



## **SAMMANFATTNING**

Den vanligaste orsaken till att hästägare söker veterinärvård i Sverige är skador och sjukdomar i hästens rörelseapparat. Den vanligaste prestationshämmande sjukdomen hos tävlingshästar är osteoartrit (OA). För att kunna häva sjukdomsförloppet vid OA krävs att en tidig detektion av sjukdomen görs, innan skadorna på leden har blivit irreversibla. Därför är det av yttersta vikt att hitta ett diagnostiskt hjälpmedel som förmår detektera OA i de tidigaste stadierna. Biomarkörer skulle kunna vara ett sådant hjälpmedel och cellytemolekylen CD163, som ses på M2 makrofagerna, tros vara en sådan markör för OA hos människa. Syftet med detta examensarbete var att med hjälp av immunocytokemi utveckla en metod för att undersöka förekomsten av CD163-positiva celler i ledvätska från häst.

För detektion av CD163-positiva celler i ledvätska användes immunocytokemi och för detektion i ledkapsel användes immunohistokemi. Två olika antikroppar riktade mot humant CD163 testades och resultat från olika typer av fixering, förbehandling av preparaten och olika antikroppskoncentrationer utvärderades.

Totalt ingick sju ledvätskeprover från sex hästar och en ledkapselbiopsi i studien, varav fem ledvätskeprover härrörde från artroskoperade hästleder där ledskadorna var makroskopiskt bedömda.

CD163-positiva celler kunde påvisas med antikroppen från R&D Systems i såväl ledvätskeprover som ledkapsel. Bäst resultat för infärgning av celler erhöles efter formalinfixering och förbehandling med värmebad och en kommersiell "antigen-retrieval"-lösning. Förbehandling medförde att en lägre koncentration av antikroppen kunde användas och en tydlig infärgning av cellerna erhöles. Det låga antalet individer inkluderade i studien samt avsaknaden av prover från friska hästleder medförde att inga slutsatser beträffande antalet CD163-positiva celler i ledvätska vid olika typer av ledsador kunde utvärderas.

Den framtagna metoden för påvisandet av CD163-positiva celler i ledvätskan möjliggör fortsatta studier för undersökning av förekomst av denna typ av celler vid olika typer av ledsador, och utvärdering av desamma som biomarkör för OA hos häst.

## **SUMMARY**

The most common reason for horses to be presented for veterinary care in Sweden is injuries affecting their locomotor system. The most common performance inhibiting disease in horses is osteoarthritis (OA). An early detection of OA is required in order to reverse the progression before the structural damage in the joint has become irreversible. It is therefore of great importance to find a diagnostic tool that enables detection of OA in its early stages. Biomarkers could be such a tool, and the cell surface molecule CD163, found on M2 macrophages, is believed to be a biomarker for OA in humans. The purpose of this study was to establish a method for detection of CD163-positive cells in synovial fluid and joint capsule from horses.

Immunocytochemistry and immunohistochemistry were used in order to detect CD163-positive cells in synovial fluid and joint capsule, respectively. Two different primary antibodies against human CD163 were used, and different methods for fixation and antigen retrieval, as well as the use of different antibody concentrations were evaluated.

In total seven samples of synovial fluid from six horses and one joint capsule biopsy were included in the study. Five synovial fluid samples originated from joints that had macroscopically been examined and evaluated during arthroscopy.

CD163-positive cells were detected with the antibody from R&D Systems in synovial fluid sample as well as in the joint capsule. The best immunostaining result were obtained when cytopsin preparations from synovial fluid were fixed in formalin and pretreated with heated water bath and a commercial antigen retrieval solution. Pretreatment resulted in usage of lower concentration of antibody and a distinct staining of the cells was obtained. Due to the low number of horses included in the study and the lack of samples from healthy joints conclusions regarding numbers of CD163-positive cells in synovial fluid with different types of joint injuries could not be made.

The method established in this study makes it possible to perform further studies of the presence of CD163-positive cells in equine synovial fluid in different types of joint injuries and evaluation of CD163-positive cells as a biomarker of OA in horses.

## INNEHÅLL

Inledning .....	1
Syfte.....	1
Hypotes.....	2
Litteraturoversikt.....	2
Synovialled .....	2
Metakarpofalangederna/metatarsofalangederna .....	5
Karpallederna .....	6
Osteoartrit.....	6
Biologiska markörer .....	8
Makrofager och CD163 .....	9
Immunocytokemi/immunohistokemi .....	10
Material och metoder.....	11
Urval av material.....	11
Gradering av leddskador.....	12
Provhantering – ledvätska.....	13
Provhantering – mjält- och ledkapselpreparat .....	13
Metodutveckling för detektion av CD163-positiva celler .....	14
Test av CD163-antikropp från Santa Cruz .....	14
Test av CD163-antikropp från R&D systems .....	16
Cellräkning.....	17
Resultat.....	18
Detektion av CD163-positiva celler med hjälp av antikropp från Santa Cruz .....	18
Detektion av CD163-positiva celler med hjälp av antikropp från R&D Systems.....	19
Celltal i ledvätska .....	21
Diskussion.....	25
Konklusion.....	28
Tack .....	30
Referenser .....	31

## INLEDNING

Skador och sjukdomar i hästens rörelseapparat är den vanligaste orsaken till att försäkrade hästar i Sverige söker veterinärvård enligt en studie av Penell *et al.*, (2005). Ledskador är dessutom den vanligaste orsaken till att försäkrade hästar avlivas i Sverige (Egenvall *et al.*, 2006). Den vanligaste prestationshämmande ledsjukdomen hos våra tävlingshästar är osteoartrit (OA) och därför finns det idag ett stort behov av att tidigt kunna detektera denna ledsjukdom (Cruz & Hurtig, 2008). Detta för att kunna behandla i ett stadie då de OA-associerade ledskadorna fortfarande är reversibla. En tidig detektion av OA, innan irreversibla skador på brosket har utvecklats, skulle förmodligen resultera i bättre återhämtning och mindre risk för recidiv. En studie har visat att 30 % av de hästar som fått veterinärvård på grund av skador och sjukdomar i rörelseapparaten söker veterinärvård igen inom ett år (Egenvall *et al.*, 2005). Studien har dock inte specificerat orsak för andra besöket.

Idag baseras diagnostiken av OA ofta på radiologiska kriterier, såsom ledhållans vidd, samt på kliniska symtom, såsom ledsvullnad, nedsatt rörlighet och smärta med påföljande hálta (Bijlsma *et al.*, 2011; Zachary & McGavin, 2012). Då dessa diagnostiska metoder oftast inte upptäcker OA innan den redan är väl etablerad och tidiga förändringar har börjat progrediera är det av stor vikt att finna ett diagnostiskt hjälpmedel som kan användas i de tidiga akuta stadierna av OA. Biomarkörer, detekterade i ledvätska, skulle kunna utgöra en metod för tidig OA-detektion och cellytemolekylen CD163 tros vara en sådan markör hos människa (Daghestani *et al.*, 2015).

CD163 har i tidigare studier fungerat som en infärgningsbar markör lokaliserad till M2 makrofagernas cellyta i vävnader hos människor (Edin *et al.*, 2012). I en studie av Daghestani *et al.*, 2015 påvisades CD163 i både ledkapsel, ledvätska och serum hos människa med diagnosticerad OA. I studien fastställdes även att det fanns ett samband mellan CD163 i serum och aktiverade makrofager i ledkapseln från patienter med OA. Förekomst av CD163-positiva celler i ledvätska från häst har ännu inte beskrivits i litteraturen. Om CD163-positiva celler kan detekteras i ledvätska från häst är det möjligt att mängden positiva celler kan avspegla ledens status och därigenom fungera som en tidig biomarkör för ledskada.

## SYFTE

Detta examensarbets syfte var att undersöka om det med hjälp av immunocytokemi och immunohistokemi gick att påvisa förekomsten av CD163-positiva celler i ledvätska respektive ledkapsel från häst.

Påvisandet av CD163-positiva celler i leder hos häst skulle kunna användas för att beräkna mängden av dessa celler vid olika typer och grader av ledpatologi. En korrelation mellan cellförekomst och ledskada skulle kunna göras i en senare större studie. Baserat på resultatet av arbetet var förhoppningen med examensarbetet att analys av CD163-positiva celler ska kunna användas som en biomarkör för OA hos häst i framtiden.



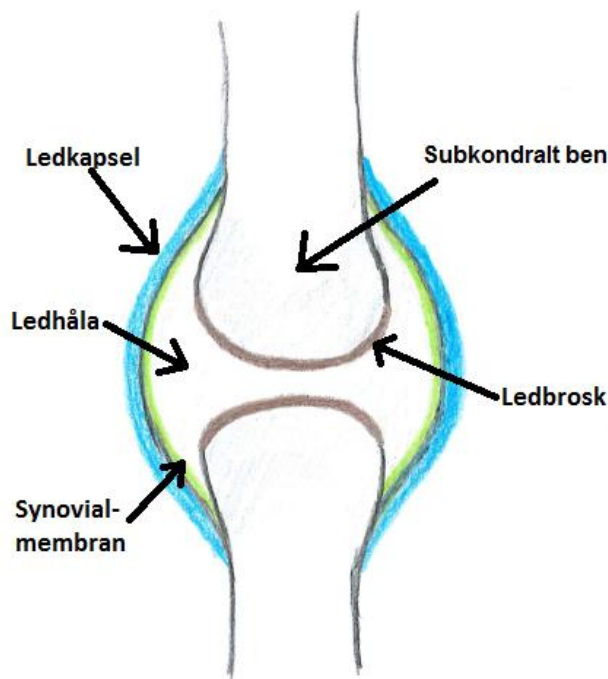
## HYPOTES

CD163-positiva celler kan påvisas i ledvätska från häst och mängden är korrelerad till typ och grad av leddkada. Detta gör förekomsten av CD163-positiva celler till en potentiell biomarkör för tidig OA-detektion.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Synovialled

En synovialled är uppbyggd av flera olika typer av vävnader (Samuels *et al.*, 2008). Centralt i leden finns ledhålan, vilken innehåller ledvätska. Ledhålan begränsas av ledkapseln vars inre yta är beklädd med synovialmembran (ledhinnan). Ledkapseln fäster in i benet proximalt och distalt om ledhålan. Den del av benvävnaden vars ledytor bekläds av ledbrosk och som då befinner sig i leden kallas subkondralt ben (Caron, 2011; van Weeren, 2013) (figur 1). Övriga strukturer som kan ingå i en synovialled är intraartikulära ligament och menisker (van Weeren, 2013). Synovialleden omges av periartikulär vävnad som består av muskler, senor och ligament (Caron, 2011).

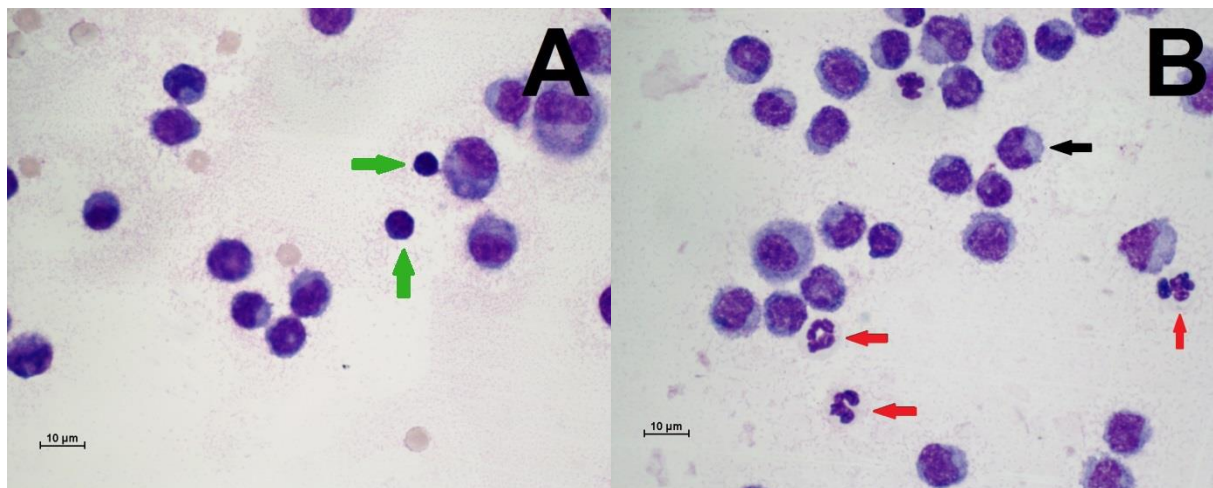


Figur 1. Schematisk bild över en synovialleds uppbyggnad. Baserat på texten i van Weeren, 2013.

Synovialmembranet utgörs av ett tunt lager med vaskulär bindväv. Med undantag av ledbrosket utlinjerar synovialmembranet den inre ytan av leden och består av två mesenkymala cell lager, den synoviala intiman och den subsynoviala intiman (Caron,

2011; Palmer & Bertone, 1994). Synovialmembranets intima saknar basalmembran och är uppbyggt av celler som är inbäddade i ett poröst lager av extracellulära matrixproteiner (van Weeren, 2013). Den subsynoviala intiman är uppbyggd av lucker bindväv och fettväv och angränsar till ledkapselns yttre fibrösa lager. Den luckra uppbyggnaden av synovialmembranet tillåter diffusion av stora molekyler mellan blodet och ledvätskan och synovialmembranet fungerar därigenom som ett ultrafilter. Cellerna i synovialmembranets intima (även kallat lining layer) är av benmärgsursprung (Johansson & Rejno, 1976) och kan delas in i två celltyper, makrofaglika synovialceller (typ A) och fibroblastlika synovialceller (typ B). Typ A celler har liksom makrofager fagocytära egenskaper och framträdande golgiapparat, lysosomer och sekretoriska vakuoler. Typ A cellerna uppvisar celltytereceptorer vilka indikerar att cellerna har en roll i det inflammatoriska och immunologiska svaret (Johansson & Rejno, 2002; Henderson & Pettipher, 1985). Typ B cellerna producerar bland annat hyaluronan och kollagen (Matsubara *et al.*, 1983; Iwanaga *et al.*, 2000). Hyaluronan fungerar både som en huvudsaklig komponent i ledvätskan, där den avgör ledvätskans tråddragighet, och som en viktig komponent i extracellulärt broskmatrix. På så sätt har synovialmembranets celler en stor betydelse för ledvätskans sammansättning (Caron, 2011) och genom riklig blodförsörjning kan synovialmembranet bidra till bibehållandet av ledens homeostas genom regenerering av ledvätska och utbyte av slaggprodukter och näringsämnen med blodet. Utbytet som sker mellan synovialmembranet och ledvätskan utgör den enda näringskedjan till de mogna kondrocyterna i ledbrosket (Caron, 2011). Ledvätskan kan anses avspegla ledens homeostas eftersom den angränsar både synovialmembranet med dess celltyper och ledbrosket (van Weeren, 2013).

Ledvätskan är en trögflytande gulaktig vätska med smörjande funktion, vilket minskar friktionen i leden (Caron, 2011; van Weeren, 2013). I ledvätskan finns det en liten mängd celler, vilka till största del utgörs av stora mononukleära celler, lymfocyter och neutrofiler (van Weeren, 2013). Dessa celler kan identifieras i ljusmikroskop med hjälp av Giemsa-färgning (figur 2). Stora mononukleära celler har en decimeter på 15-20  $\mu\text{m}$  (Kierszenbaum, 2007). Kärnan hos en typisk stor mononukleär cell är njurformad och cellerna har rikligt med cytoplasma fylld med små lysosomer vilket ger cytoplasman ett grynigt utseende. Lymfocyter är ca 7-12  $\mu\text{m}$  i diameter. Deras kärna är rund och något indenterad och upptar större delen av cellytan varför cytoplasman endast ses som en tunn inramning runt cellkärnan. Neutrofilernas diameter är 12-15  $\mu\text{m}$ . Kärnan är i regel segmenterad i 3-5 lobber och omges av rikligt med cytoplasma.



Figur 2. Giemsafärgade cytospinpreparat på ledvätska (1000x med olja). (A) Lymfocyter (gröna pilar) och stora mononukleära celler ses på bilden. (B) Neutrofiler (röda pilar) och flera mononukleära celler med njurformad kärna typisk för makrofager (svart pil) kan ses.

Ledkapselns yttre lager består av ett stumt fibröst lager (van Weeren, 2013). I det fibrösa lagret finns förutom fibroblaster i ett tätt kollagent matrix också proprioceptiva nervändar som signalerar till hjärnan om ledens position. Det yttre lagrets främsta funktion är att ge mekanisk stabilitet till leden.

Ledbrosket är uppbyggt av kondrocyter, vatten och extracellulärt matrix, vars huvudkomponenter är kollagen och proteoglykaner (van Weeren, 2013; Caron, 2011). Kollagenet består huvudsakligen av kollagen typ II fibrer. Dessa bygger upp ett tredimensionellt nätverk och fäster in i det förkalkade (kalcifierade) brosklagret (van Weeren, 2013). Det kollagena nätverket bidrar till broskets slittålighet. Proteoglykanmolekylerna bildar aggregat som är inflettade i det kollagena nätverket antingen genom att vara bundna direkt till kollagenfibrerna eller via hyaluronanmolekyler. Den största andelen proteoglykaner i brosket utgörs av aggrecan. Aggrecan består av ett kärnprotein och ett stort antal sulfaterade glukosaminoglykaner som sidokedjor. Sulfatgrupperna ger sidokedjorna en negativ laddning och gör dem hydrofila. Detta medför att proteoglykanaggregaten drar in vatten i det stela kollagennätverket och skapar ett inre tryck i extracellulärt matrix vilket ger ledbrosket elasticitet. Alla komponenter till extracellulärt matrix produceras av kondrocyter, vilka är den enda celltyp som finns i normalt ledbrosk. Ledbrosket är en aktiv vävnad då det hela tiden genomgår remodelering genom anabola och katabola processer reglerade av kondrocyterna. De katabola processerna i extracellulärt matrix medieras av olika proteinaser, varav matrix metalloproteinaser (MMP) och aggrecanaser är de två viktigaste. Ledbrosket är uppbyggt av flera zoner vilka uppvisar olika morfologiska och biokemiska egenskaper (Caron, 2011). Den yttliga zonen (tangentiella zonen) uppvisar kondrocyter som är orienterade parallellt utmed ledytan och är inbäddade i ett extracellulärt matrix bestående av kompakt packat kollagen typ II, relativt få proteoglykaner och med högt vatteninnehåll (Caron, 2011; van Weeren, 2013). I den mellersta zonen (övergångszonen) är kondrocyterna till synes slumpmässigt fördelade i ett mindre kompakt och mer ostrukturerat kollagen

typ II matrix, med lägre vattenhalt och fler proteoglykanaggregat. I den djupa zonen är kondrocyterna arrangerade i staplar, så kallade myntrullar, orienterade vertikalt mot ledytan. Cellerna är inbäddade i ett extracellulärt matrix där kollagen typ II är strukturerat vertikalt mot ledytan. Denna zon har lägst vattenprocenthalt av dessa tre nämnda zoner och högst koncentration av proteoglykaner (van Weeren, 2013). I den djupare förkalkade zonen innerhåller matrix hydroxyapatitkristaller och denna zon angränsar till det subkondrala benet (Caron, 2011). Ledbrosket ger en utjämnad yta i leden (Loeser *et al.*, 2012) och tillåter på så vis samtidig rörelse och belastning med försumbar friktion (Caron, 2011). Ledbroskets tjocklek varierar beroende på led och lokalisering (Caron, 2011). Ledbrosket är därmed inte jämntjockt längs med hela ledytan utan anpassat till vilken kraft den delen av leden utsätts för, så som låggradig frekvent belastning, intermittent belastning eller kraftig belastning (Herzog & Federico, 2006).

Det subkondrala benets histologiska och biokemiska bild är identisk med trabekulärt ben på andra platser i kroppen och uppvisar ett kollagen typ I rikt extracellulärt matrix (Caron, 2011). Den subkondrala benplattan, närmast ledbrosket, är emellertid tunnare men mer kompakt än övrigt kortikalt ben och det haverska systemet är orienterat parallellt med ledytan istället för parallellt med benets längdaxel (van Weeren, 2013; Caron, 2011). Det subkondrala benet är rikligt vaskulariserat med välutvecklad nervförsörjning, vilket innebär att det har en stor betydelse för smärtupplevelsen vid exempelvis ledsjukdomar. Det subkondrala trabekulära benet har en elastisk funktion och minskar belastningen på leden genom att verka stötdämpande och absorbera kraft (Caron, 2011). Den subkondrala benplattan verkar stödjande för det överliggande ledbrosket, genom förankringen med den förkalkade broskzonen (van Weeren, 2013).

### **Metakarpofalanglederna/metatarsofalanglederna**

Kotleden (metakarpofalangen och metatarsofalangen) begränsas skelettalt av metakarpalben III (MCIII) respektive metatarsalben III (MTIII), den proximala falangen (PI) samt två kotsenben (Dyce *et al.*, 2010). Kotsenbenen fungerar framför allt som en förstoring av ledytan och möjliggör en större flexions- och extensionsrörelse i leden. Kotleden är en roterande gångjärnsled och den av hästens leder som har det största rörelseomfånget, från 120° extension till 120° flexion (Bertone, 2004). Det är en högt belastad led, vilket medför att kotleden skadas frekvent hos arbetande hästar (Kawcak *et al.*, 2000). Kotleden har i huvudsak två funktioner, att under rörelse agera viktbärande under isättningsfasen och belastningsfasen samt att dämpa den största delen av stöten som uppkommer i stegcykeln då hoven får kontakt med marken (Copelan & Bramlage, 1983). Skador i kotleden kan drabba alla typer av hästar men är vanligast då kotleden utsätts för arbete i höga hastigheter (Richardson & Dyson, 2011). För att kotleden inte ska översträckas vid kraftig belastning stabiliseras kotleden upp palmar/plantar av djupa och ytliga böjsenan, gaffelbandet samt flertalet ligament så som de abaxiala och axiala palmarligamenten/plantarligamenten (Richardson & Dyson, 2011; Dyce *et al.*, 2010). OA-associerade förändringar och ostekondrala fragment (lösa benbitar) ses

vanligen i kotleder på tävlingshästars framben och anses uppkomma till följd av att de tar mycket belastning under arbete i höga hastigheter (Bertone, 2004; Dyce *et al.*, 2010).

## Karpallederna

Karpallederna utgörs av tre ledavdelningar: radiokarpalleden, interkarpalleden och karpometakarpalleden (Richardson & Dyson, 2011). Proximala begränsningen på karpallederna är *os radius* och distalt metakarpalben III. Mellan dessa ben är två rader med sju eller åtta mindre karpalben. Den övre raden består av fyra karpalben, ärtbenet (*os accessorius*), *radialis (os carpi radiale)*, *intermediare (os carpi intermediale)* och *ulnaris (os carpi ulnaris)*. Den undre raden innefattar karpalben II, II, IV och hos vissa individer även karpalben I. Det första karpalbenet är väldigt litet, eller saknas, och anses sakna funktion i leden (Dyce *et al.*, 2010). Karpometakarpalleden kommunicerar med interkarpalleden. Karpallederna fungerar tillsammans som en gångjärnsled och tillåter bara rörelse i ett rörelseplan (Richardson & Dyson, 2011). Den största rörelsen tillåts i radiokarpalleden där upp till 100° flexion tillåts (Dyce *et al.*, 2010). Mellersta karpalleden är relativt rörlig och tillåter en rörelse på runt 45° medan karpometakarpalleden är i stort sätt orörlig.

## Osteoartrit

OA är en inflammatorisk degenerativ ledsjukdom som drabbar en eller flera synovialleder (Goldring & Goldring, 2007; Sellam & Berenbaum, 2010). OA benämns även artros, men denna term avspeglar inte att det ingår en tidig inflammationskomponent i sjukdomen. Idag är OA den vanligaste ledåkomman hos människa och medför minskad livskvalitet för de drabbade individerna. Karakteristiska lesioner för OA är erosion av ledbrosk samt varierande grad av synovit, osteofytbildning, fibros i ledkapseln och skleros (ökad täthet) i det subkondrala benet (Goldring & Goldring, 2007; Caron, 2011; Loeser *et al.*, 2012; Lacourt *et al.*, 2012). Andra förändringar som kan ses i det subkondrala benet i samband med OA är mikrofrakturer, subkondrala bencystor och vaskulär inväxt från det subkondrala benet till den kalcifierade broskzonen (Buckland-Wright, 2004; Lane *et al.*, 1977; Burr & Schaffler, 1997). Såväl unga som äldre hästar kan drabbas av OA och detta kan yttra sig antingen symtomatiskt eller asymtomatiskt. (Zachary & McGavin, 2012). De initiala ledförändringarna är sannolikt ett resultat av mekanisk överbelastning med påföljande traumatisk skada på ledbrosket, ledkapselsinflammation och skleros i det subkondrala benet. Mekanisk överbelastning kan ses vid olika typer av hård träning eller vid abnormiteter i ledens utformning, vilket påverkar ledens stabilitet och den anatomiska överensstämmelsen mellan ledytorna.

Den fullständiga etiologin och patogenesen för OA är i dagsläget emellertid okänd, men det är sannolikt att OA innefattar flera sjukdomstillstånd som leder till samma slutskede (Zachary & McGavin, 2012). Det finns idag tre hypotetiska huvudsakliga patologiska mekanismer för OA hos häst (Caron, 2011).

Den första hypotesen bygger på grundläggande defekter i ledbrasket vilket ger brosket onormala biomekaniska egenskaper (Caron, 2011). Detta leder till att brosket inte klarar av normal belastning. Hos människa finns en ärftlig del i denna patogenes men ingen sådan ärftlig defekt har ännu kunnat visas på häst.

En andra patogenes involverar primära förändringar i det subkondrala benet (Caron, 2011; Lacourt *et al.*, 2012). Skleros i det subkondrala benet leder till att benet förlorar sin kraftdämpande förmåga. När benet förlorar sin kraftdämpande effekt medför detta ökad stress på ledbrasket som då inte kan absorbera den ökade kraften. Detta resulterar i sin tur i att normal belastning ger upphov till mikrofrakturer i det subkondrala och epifysära trabekulära benet, vilket leder till ytterligare skleros och omorganisering i det subkondrala benet (Caron, 2011). När detta sker överbelastas ledbrasket eftersom det inte klarar av att deformeras normalt under trycket från normal belastning. Sammanfattningsvis så utsätts friskt brosk för en överbelastning av normal kraft på grund av en primär skada i det subkondrala benet.

Den tredje hypotesen bygger på att friskt brosk skadas av mekanisk överbelastning vid till exempel mycket hård träning (Caron, 2011). Detta innebär att normalt ledbrusk utsätts för kraftigare fysisk ansträngning än vad det klarar av.

Gemensamt för dessa tre teorier är mekanisk överbelastning av ledbrusk (Caron, 2011). När broskmatrix och celler skadas av överbelastningen sker en metabolisk förändring hos kondrocyterna vilket resulterar i frisättning av proteolytiska enzymer som bryter ner proteoglykanaggregat. Då proteoglykanaggregaten bryts ner och inte binder vattnet normalt ökar vattenmängden i ledbroskets matrix vilket leder till att vävnaden svullnar (Zachary & McGavin, 2012). Proteoglykanaggregatens nedbrytning följs av kollaps av det kollagena nätverket då det inte längre hålls isär av den gel som proteoglykaner och vatten tillsammans bildar. Detta medför att ledbrasket blir mjukt och en uppfibring av ytlagret påbörjas med lesioner i form av slipfårar och erosioner.

Synovit i samband med OA kan vara primär men anses oftast uppstå sekundärt till ledbroskskadan (Zachary & McGavin, 2012). Inflammationsmediatorer frisätts exempelvis från synoviala makrofager som fagocyterat nedbrytningsprodukter från brosket. OA anses därför innefatta ett aktivt inflammatoriskt svar på ledskada och inte bara inkludera en nedbrytande process (Loeser *et al.*, 2012).

Synoviocyterna producerar proinflammatoriska mediatorer så som prostaglandiner och cytokiner samt nedbrytande enzymer så som aggregaser och MMP's, vilka spelar en stor roll vid nedbrytningen av ledbrasket (Scanzello & Goldring, 2012). Av cytokinerna anses interleukin-1beta (IL1 $\beta$ ) och tumör nekros faktor alfa (TNF- $\alpha$ ) ha en betydande roll för nedbrytning av broskets extracellulära matrix och uppkomsten av ledskador (Gao *et al.*, 2014; van Weeren, 2013). Förändringarna i synovialmembranet kan innebära en minskad produktion av broskskyddande faktorer och broskmatrix komponenter samtidigt som det kan ge en ökad koncentration av faktorer som bidrar till nedbrytning av ledbrusk (Gao *et al.*, 2014). Cytokinerna tros

dels diffundera in i ledbrösket och där stimulera kondrocyter men även stimulera fler synoviocyter att producera cytokiner och proteinaser varpå koncentrationer av nedbrytningsprodukter från proteoglykan- och kollagenmetabolism återfinns i ledvätskan (Martel-Pelletier *et al.*, 1999). Både inflammationsprodukter och nedbrytningsmetaboliter är potentiella biomarkörer för OA (van Weeren, 2013). I en inflammerad led ökar permeabiliteten i synovialmembranet vilket medför att koncentrationen av stora molekyler som normalt inte kan passera membranet, så som hyaluronan, minskar i ledvätskan (Scanzello & Goldring, 2012). Histologiska förändringar som kan ses i synovialmembranet hos individer med OA är fibros, synoviocythyperplasi, förekomst av debris från brosk och ben samt infiltrat av makrofager, plasmaceller och lymfocyter (Oehler *et al.*, 2002). Graden av inflammation, framför allt i form av mängd makrofagerinfiltrat (Farahat *et al.*, 1993), vid OA har visats sig korrelera till symtomens allvarlighet samt hastigheten på brosknedbrytningen och osteofytbildningen (Scanzello & Goldring, 2012; Oehler *et al.*, 2002).

Vid OA är det vanligt att ledvätskan är mindre tråddragande. Detta kopplas till en minskad koncentration eller depolymerisering av hyaluronan i ledvätskan (Caron, 2011).

## **Biologiska markörer**

Uttrycket biologiska markörer används inom biomedicin och definieras på många olika sätt. Enligt the Biomarkers Definitions Working Group definieras en biomarkör som något som mäts objektivt och kan utvärderas som en indikator för normala biologiska processer, patologiska processer eller farmakologiska svar på en behandling (Atkinson *et al.*, 2007). Det finns flera olika användningsområden för biomarkörer. En biomarkör kan användas som ett diagnostiskt redskap för att identifiera patienter med en viss sjukdom, ett verktyg för att fastställa en sjukdoms progression, en indikator för patientens prognos vid ett sjukdomstillstånd eller för att förutse och följa det kliniska svaret på en behandling. Biomarkörer kan vara användningsbara markörer för sjukdomsförlopp och detekteras i blod, serum, ledvätska och urin (Mobasheri, 2012).

De tekniska framstegen inom molekylärbiologin har inneburit att potentiella biomarkörer inte bara utgörs av proteiner eller proteinfragment utan också metaboliter, kolhydrater, genomiska biomarkörer (DNA och RNA) (Kraus *et al.*, 2011), celler och bilddiagnostik (Atkinson *et al.*, 2007).

Det finns flera olika biomarkörer för OA som kan ge viktig information vid OA-diagnostiken (Rousseau & Garnero, 2012). Målet med flera av de pågående forskningsprojekten inom OA-diagnostik är att upptäcka biomarkörer som kan påvisa tidiga reversibla förändringar och förhoppningsvis med en panel av biomarkörer ge en uppfattning om var i skadeförloppet leden befinner sig.

## **Makrofager och CD163**

Makrofager är enkärninga celler vars cytoplasma innehåller mitokondrier, flertalet lysosomer, fria ribosomer, RER (rough endoplasmic reticulum) och en golgiapparat vilket ger makrofagen möjlighet att syntetisera och utsöndra proteiner (Tizard, 2009). I vävnaden finns residenta makrofager. Monocyter, omogna makrofager i blodet, rekryteras vid inflammation och differentieras ut till makrofager när de träder in i vävnaden (Stein *et al.*, 1992). I vävnaden fungerar makrofagerna som sentinelceller vilket innebär att de agerar som kroppens första försvarslinje mot mikroorganismer (Tizard, 2009). Men makrofagernas sentinelfunktion är inte bara att detektera mikroorganismer och skicka ut signalsubstanter till andra celler i kroppen och på så vis trigga en immunologisk respons, utan makrofagerna kan även själva avdöda mikroorganismer genom fagocytos. När makrofagerna fagocyterar tar de upp mikroorganismer och innesluter dem i sitt cytoplasmamembran för att sedan bryta ner dem. Makrofagerna spelar även en stor roll för vävnadsläkning genom att fagocytera döda, döende eller skadade celler och vävnad.

Makrofager kan delas in i två fenotyper, M1 och M2 (Mosser & Edwards, 2008). M1 makrofager representerar klassiskt aktiverade makrofager, specialiserade på avlägsnande av intracellulära patogener. Alternativt aktiverade makrofager (M2), uppvisar immunosuppressiva och antiinflammatoriska egenskaper och är involverade i avlägsning av debris, angiogenes och vävnadsreparation. Vilken fraktion makrofagerna differentierar ut till bestäms av vilka interferoner och interleukiner monocytorna utsätts för under differentieringen (Stein *et al.*, 1992). För att en makrofag ska differentiera ut till M2 krävs interaktioner med IL-4, IL-10 eller IL-13 som utsöndras av T-hjälparceller (Tizard, 2009).

Graden av inflammation i leden och vilka proinflammatoriska substanser som finns i ledvätskan kan påverka makrofagernas beteende och differentiering (Lopa *et al.*, 2015). Ett visst samband mellan ledvätskans sammansättning och vilken makrofagfenotyp (pro- eller antiinflammatoriska) som är mest aktiv har kunnat ses hos människor med OA. Det är troligt att typen av makrofager är av stor klinisk betydelse för huruvida ledskadorna utvecklas eller avläker. Studier har visat att typ A synoviocyter har en drivande roll i inflammationen av synovialmembranet och ledbroskdegenerationen vid OA (Ambarus *et al.*, 2012; Bondeson *et al.*, 2006; Benito *et al.*, 2005). En studie visar också att makrofager har en drivande roll vid uppkomsten av strukturella skador samt vid progressionen av OA med osteofytbildning (Daghestani, 2015). Makrofager anses även ge upphov till läkningsfrämjande egenskaper, vilka kan ha stor betydelse vid kronisk OA (Ambarus *et al.*, 2012; Fahy *et al.*, 2014 ).

CD163 är en känd markör för M2 makrofager (Buechler *et al.*, 2000; Moghaddami *et al.*, 2004). Hos människa uttrycks CD163 endast av monocyter/makrofager och uttrycket av CD163 uppregleras vid cellaktivering (Hogger *et al.*, 1998; Philippidis *et al.*, 2004). CD163 kallas ibland för "scavenger receptor" (renhållningsreceptor), eftersom M2 makrofager fagocyterar debris i vävnader. Under de tidiga stadierna av

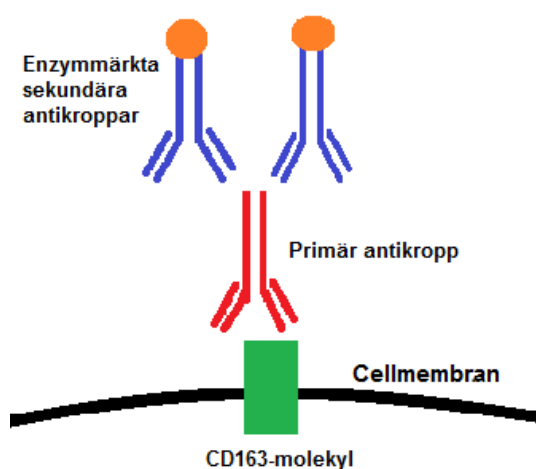


OA kan framför allt M2 makrofager påvisas i ledkapseln medan ett mer blandat uttryck av både M1 och M2 makrofager är närvarande under de senare stadierna (Fahy *et al.*, 2014). I en studie påvisades CD163-molekyler i både ledkapsel, ledvätska och serum hos människor med OA (Daghestani *et al.*, 2015). I samma studie påvisades även ett samband mellan CD163-molekyler i serum och aktiverade makrofager i leden på patienter med OA.

## Immunocytokemi/immunohistokemi

Immunocytokemi och immunohistokemi är två metoder som används för att påvisa antigen, så som cell-associerade proteiner eller peptider (Kumar *et al.*, 2009). Immunocytokemi används för att färga in celler utan omgivande extracellulärt matrix medan immunohistokemi används vid färgning av celler i intakta vävnader.

Båda metoderna går ut på att påvisa antigen med hjälp av antikroppar (Kumar *et al.*, 2009). Antigenet visualiseras genom att använda en antikropp riktad mot det specifika antigenet. Visualiseringen kan utföras med en direkt eller indirekt metod. Den direkta metoden använder sig av en antikropp som är märkt för vidare detektion, vilket medför att antigenets lokalisation kan göras synlig då antikroppen fäster in. Denna metod är oftast inte känslig nog då det finns för få antigen på cellytan för att få en tillräckligt stark visualisering. Den indirekta metoden bygger på två antikroppar, en primär och en sekundär. Precis som i den direkta metoden fäster en antikropp, den primära, in till antigenet, men denna antikropp är inte märkt utan måste i sin tur visualiseras med hjälp av en märkt sekundär antikropp som är riktad mot den primära antikroppen. Till varje primärantikropp kan sedan flera sekundära antikroppar fästa in vilket gör denna metod känsligare och man får ett tydligare resultat (figur 3). Antikropparna som används för detektion av antigenet är antingen monoklonala eller polyklonala. Monoklonala antikroppar bildas av plasmacellskloner och är därför identiska med varandra. Polyklonala antikroppar bildas av olika celler och binder därför till olika epitoper på antigenet de är riktade mot.



Figur 3. Schematisk bild på principerna för indirekt immunocytochemi med CD163 som exempel på antigen. Figuren är baserad på texten från Kumar et al., 2009.

För att göra den slutliga visualiseringen av lokaliseringen för antigenet är antikroppen märkt med en fluorescerande substans eller ett enzym (Boenisch, 2009). Ett enzym som används till detta är "horseradish peroxidase" (HRP). HRP katalyserar reaktionen som sker då väteperoxid bryts ner till syre och vatten. För att denna reaktion ska kunna ske krävs en elektrondonator så som 3,3'-diaminobenzidine (DAB) som vid oxidering producerar en brun slutprodukt vid reaktionsplatsen, vilket ses ljusmikroskopiskt.

Innan färgningen måste vävanden fixeras för att förhindra autolys och bevara epitoperna som antikropparna ska binda till (Ramos-Vara et al., 2008). I vissa fall utförs även en förbehandling (en så kallad "antigen retrieval"). Målet med "antigen retrieval" är att göra antigenet mer mottagligt för detektion av antikroppen samt att vända på skadeeffekterna som kan ha erhållits av fixeringsmetoden, till exempel strukturella förändringar som kan modifiera epitopen. Denna förbehandling kan utföras i varmt vattenbad och kallas då för HIER ("heat induced epitope retrieval"). För detta finns kommersiellt tillgängliga lösningar som till exempel DiVA Decloaker. Den exakta mekanismen för hur "antigen retrieval" fungerar är inte helt fastställd (Boenisch, 2006).

## MATERIAL OCH METODER

### Urval av material

Det material (tabell 1) som användes i studien var ledvätska från fyra hästar med klinisk misstanke på ledskada som genomgått artroskopi på Mälaren Hästklinik, ledvätska från två hästar analyserade på Klinisk kemiska laboratoriet, Universitetsdjursjukhuset (UDS), med konstaterat leukocytantal över  $4000 \times 10^6$  celler/L och med hög andel stora mononukleära celler, formalinfixerad paraffinbäddad ledkapselvävnad från kotled från obducerad häst med OA och kronisk hyperplastisk synovit, samt mjältvävnad och mjältutstryk från obducerad häst med myocardit.

Sammanlagt ingick totalt sju ledvätskeprover från sex hästar i ledvätskestudierna. Fem prover kom från fyra artroskoperade hästar (Mälaren Hästklinik) samt två ledvätskeprover kom från hästar med mer än  $4000 \times 10^6$  celler/L (Klinisk kemiska laboratoriet, UDS).

Inklusionkriterierna för ledvätska från Mälaren Hästklinik var artroskopi i diagnostiskt eller behandlingssyfte utförd på karpalleder eller kotleder under september och oktober månad 2015. Hästar av alla raser, åldrar, sjukdomsduration och sjukdomsbild inkluderades för att få stor variation i materialet. Hästarnas ras, kön och ålder dokumenterades. För deltagande i studien krävdes skriftliga djurägarmedgivanden. Etisk ansökan för studien var godkänd (diarienummer

C62/13). Exklusionkriterier var, av praktiska skäl, artroskopi utförd på helger eller efter klockan 15.00 på vardagar.

Tabell 1. *Material och undersökningsmetod avseende förekomst av CD163-positiva celler.*

Material	Antal prover	Metod
Ledvätska, >4000 x10 <sup>6</sup> celler/L	2	Immunocytochemi
Ledvätska från artroskopi	5	Immunocytochemi
Mjälte	1	Immunocytochemi/Immunohistokemi
Ledkapsel	1	Immunohistokemi

### **Gradering av ledskador**

Skador i synovialmembran och ledbrosk graderades av hästkirurg i samband med artroskopi enligt ett modifierat protokoll (tabell 2) baserat på ett protokoll framtaget av McIlwraith *et al.* (2010).

Tabell 2. Gradering av ledskador vid artroskopi

Typ av lesion	Gradering	Förklaring
Synovialmembran, synovit	0	Utan anmärkning
	1	Akut lindrig (mild hyperemi, +/- ödem, inga blödningar eller fibrin)
	2	Akut måttlig (måttlig hyperemi, +/- ödem, sparsam förekomst av fibrin och/eller blödningar)
	3	Akut kraftig (måttlig-kraftig hyperemi, omfattande förekomst av fibrin och/eller blödningar, +/- ödem)
	4	Kronisk (ingen eller mild hyperemi, hypertrofierade villi)
Ledbrosk karpus, erosion	0	Utan anmärkning
	1	Ytliga skador
	2	Erosion genom en del av brosket
	3	Erosion genom en del av brosket och genom hela brosket
	4	Utbredda erosioner genom hela brosket ner till subchondralt ben
Ledbrosk kotled, slipfårar	0	Utan anmärkning
	1	1-2 fåror som går genom en del av brosket
	2	3-5 fåror som genom en del av brosket eller 1-2 fåror genom hela brosket
	3	> 5 fåror som går genom en del av brosket eller över två som går igenom hela brosket
Ledbrosk kotled, erosion	0	Utan anmärkning
	1	Erosion genom en del av brosket under 5 mm i diameter
	2	Erosion genom en del av brosket över 5 mm i diameter
	3	Erosion genom hela brosket

### Provhantering – ledvätska

Ledvätska samlades vid artroskopins början i sterila EDTA rör. Proverna transporterades kylt till laboratorium (Klinisk kemiska laboriet, UDS) samma dag för räkning av totalantal leukocyter samt preparering av cytospinpreparat på Superfrost Plus Gold objektsglas (Thermo Scientific, MA, USA) vilka lagrades i -20°C.

### Provhantering – mjält- och ledkapselpreparat

Mjälte provtogs inom 24 timmar *post mortem*. Mjältpreparat för immunocytokemi preparerades genom utstryk och vävnadsavtryck på Superfrost Plus Gold glas.

Preparaten fick lufttorka och förvarades därefter i frys i  $-20^{\circ}\text{C}$ . Mjältvävnad för immunohistokemi fixerades i buffrad 10 % formalin. Vävnaden dehydrerades och bäddades därefter i paraffin inför snittning. Formalinfixerad, paraffininbäddad ledkapsel från kotled med kronisk proliferativ synovit, fanns tillgänglig från tidigare obduktionsmaterial. Preparaten snittades till  $4\text{ }\mu\text{m}$  tjocklek och placerades på Superfrost Plus Gold objektsglas.

### **Metodutveckling för detektion av CD163-positiva celler**

I studien utvärderades två polyklonala get anti-human CD163 antikroppar (cs-18794, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, och AF1607, R&D Systems, Minneapolis, MI, USA). Utöver detta användes två olika framkallningskit, ett från Santa Cruz (Santa Cruz staining system, sc-2023) innehållande åsneserum, biotinylerad sekundär antikropp, reagent A, reagent B, substratbuffert, DAB kromogen samt peroxidas substrat och ett kit från Vecta Stain (PK-4005, Southfield, MI, USA) innehållande biotinylerad sekundär antikropp, normalt kaninserum, reagent A och reagent B.

En tillfredställande fixeringsmetod provades ut under metodutvecklingen och varierade därför beroende på experiment. Samtliga tvättar av preparaten i experimenten utfördes i fosfatbuffrad saltlösning (PBS) tre gånger om vardera 5 min.

Följande protokoll användes för samtliga experiment. Efter fixering (med hjälp av olika fixeringsmetoder) tvättades preparaten i PBS. Endogent peroxidas blockeras genom att preparaten placeras i 3 % väteperoxid, i 5 min följt av tvättning i PBS. Efter tvättningen förbehandlades preparaten i  $95^{\circ}\text{C}$  vattenbad (med olika förbehandlingslösningar) varpå ytterligare en tvättning i PBS utfördes. Preparaten inkuberades med 1.5 % blockingserum (åsneserum för Santa Cruz antikropp och normalt kaninserum för R&D systems antikropp) spädd i PBS i en fuktkammare under 60 min i rumstemperatur. Blockingserumet dränerades från preparaten som sedan inkuberades över natten med primär antikropp mot CD163 respektive negativ kontroll (getserum) i en fuktkammare i  $4^{\circ}\text{C}$ . Dagen därpå tvättades preparaten i PBS för att sedan inkuberas 30 min i rumstemperatur med den sekundära antikroppen (biotinylerad åsna anti-get IgG för Santa Cruz antikropp och biotinylerad kanin anti-get IgG för R&D Systems antikropp) i en fuktkammare. Därefter tvättades preparaten ytterligare min i PBS. Preparaten inkuberades 30 min med AB-enzymreagent följt av ännu en tvätt i PBS.

Framkallning utfördes med hjälp av DAB och reaktionen avbröts då önskad infärgning erhöles. Innan montering kärnfärgades preparaten med Mayer's haematoxylin och rehydrerades genom graderad alkohol och xylol.

### **Test av CD163-antikropp från Santa Cruz**

För att utvärdera inmärkning av CD163-positiva celler med antikroppen från Santa Cruz utfördes immunocytochemi på utstryk av mjälte i tre olika koncentrationer. Preparaten fixerades enligt rekommenderad metod från företaget (Santa Cruz) i 5

min i  $-20^{\circ}\text{C}$  metanol. Preparaten förbehandlades 40 min i  $95^{\circ}\text{C}$  vattenbad med Diva Decloaker (Biocare Medical, DV2004MX, Concord, CA, USA) eller citratbuffert (10mM sodium citrat, 0.05% PBS Tween 20, pH6) (tabell 3). Framkallning utfördes med hjälp av den DAB som följde med i Santa Cruz framkallningskit och reaktionen avbröts efter 15 minuter.

Tabell 3. *Fixering, förbehandling, koncentration av CD163-antikropp (Santa Cruz) och framkallningsmetod av utstryk från mjälte*

Material	Fixeringsmetod	Förbehandling	Koncentration (µg/ml)	DAB*
Mjältutstryk	Metanol -20°C	Ingen	10, 5, 1	Santa Cruz
		95°C Citratbuffert	10, 5, 1	Santa Cruz
		95°C Diva Decloaker	10, 5, 1	Santa Cruz

\* = 3, 3-diaminobenzidine

Immunohistokemi på formalinfixerad paraffinbäddad mjälte och ledkapsel föregicks av avparaffinering i X-TRA Solv (MEDITE GmbH, Burgdorf, Tyskland) och rehydrering genom sjunkande koncentration av alkohol. De förbehandlingar och olika koncentrationer av primärantikroppen som användes anges i tabell 4. Framkallning utfördes med hjälp av den DAB som ingick i Santa Cruz framkallningskit och reaktionen avbröts efter 15 minuter.

Tabell 4. *Förbehandling, koncentration av CD163-antikropp (Santa Cruz) och framkallningsmetod av preparat från formalinfixerad paraffinbäddad mjälte samt ledkapsel*

Material	Förbehandling	Koncentration (µg/ml)	DAB*
Mjälte	95°C Diva Decloaker	10, 5, 1	Santa Cruz
	95°C Citratbuffert	10, 5, 1	Santa Cruz
Ledkapsel	95°C Diva Decloaker	10, 5, 1	Santa Cruz
	95°C Citratbuffert	10, 5, 1	Santa Cruz

\* = 3, 3-diaminobenzidine

Experimentet upprepades med ytterligare två lägre koncentrationer av primär antikroppen men framkallning gjordes denna gång med DAB från Dako REAL™ (K400911-2, Glostorp, Denmark) (tabell 5). Reaktionen avbröts efter 15 minuter.

Tabell 5. *Förbehandling, koncentration av primärantikropp (Santa Cruz) och framkallningsmetod av preparat från formalinfixerad paraffinbäddad mjälte samt ledkapsel*

Material	Förbehandling	Koncentration (µg/ml)	DAB*
Mjälte	95°C Citratbuffert	10, 5, 1	Dako REAL™
	95°C Diva Decloaker	10, 5, 1	Dako REAL™
Ledkapsel	95°C Citratbuffert	10, 5, 1	Dako REAL™
	95°C Diva Decloaker	10, 5, 1, 0.4, 0.04	Dako REAL™

\* = 3, 3-diaminobenzidine

### **Test av CD163-antikropp från R&D systems**

För att utvärdera antikroppen från R&D systems genomfördes samma experiment på formalinfixerad paraffinbäddad mjälte och ledkapsel som de ovan beskrivna för antikroppen från Santa Cruz, men primärantikroppen användes i koncentrationerna 5 µg/ml, 1 µg/ml samt 0.5 µg/ml. Protokollet skiljde sig även genom att ett

framkallningskit från Vectastain (PK-4005, Southfield, MI, USA) användes istället för det från Santa Cruz. Som blockingsserum användes normalt kanin serum (Normal rabbit serum från Vectastains framkallningskit), spädd i PBS till 1.5 % och som negativ kontroll användes get IgG (Goat IgG, code no. 005-000-002, Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA).

Vid immunocyto kemi av mjältutstryken testades tre olika fixeringsmetoder: 5 min i -20°C metanol (rekommenderat av R&D Systems), 2 min i kyld aceton samt 10 min i 1 % formalinlösning. Mjältutstryken förbehandlas i 95°C vattenbad med Diva Decloaker. Koncentrationerna av primär antikropp som användes vid detta experiment var 1 µg/ml, 0.5 µg/ml och 0.25 µg/ml. Den lägre koncentrationen används för att utvärdera lägsta användbara primärantikroppskoncentration.

Sista steget i metodutvecklingen var att undersöka om CD163-positiva celler kunde påvisas i cytospinpreparat från ledvätska med den framtagna metoden baserad på användandet av antikroppen från R&D Systems. Protokollet testades först på ledvätskeprov med känt hög förekomst av mononukleära celler (prov 1; tabell 6).

Tabell 6. *Fixeringsmetod, förbehandling och koncentrationer av CD163-antikropp (R&D Systems) och framkallningsmetod av immunocyto kemi på ledvätskeprov 1*

Material	Fixeringsmetod	Förbehandling	Koncentration (µg/ml)	DAB*
Prov 1	1 % formalin	95°C Diva Decloaker	0.25	Dako REAL™
		Obehandlad	0.25	Dako REAL™
	Metanol	95°C Diva Decloaker	0.25	Dako REAL™
	Aceton (utstryk)	95°C Diva Decloaker	0.25	Dako REAL™

\* = 3,3-diaminobenzidine

En lägre koncentration av primär antikroppen, 0.1 µg/ml, testades på ytterligare ett cytospinpreparat med tidigare känt hög förekomst av stora mononukleära celler (prov 2). Detta cytospinpreparat förbehandlades med Diva Decloaker, fixerades i 1 % formalin. Framkallningsreaktionen avbröts efter 3 min.

Den framtagna metoden användes sedan med primär antikroppskoncentrationen 0.25 µg/ml på 5 ledvätskeprover insamlade vid artroskopi utförd på Mälaren Hästklirik. Cytospinpreparaten fixerades i 1 % formalinlösning och förbehandlades i Diva Decloaker. Därefter följdes det ovan beskrivna protokollet fram till framkallning med DAB från Dako REAL™ då reaktionen avbröts efter 40 sek.

## Cellräkning

Klinisk kemiska laboriet, UDS, beräknade totalantal leukocyter i samtliga ledvätskeprover med hjälp av Advia 2120 hematology system (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL).



Resultat från differentialräkning på de två proverna med mer än  $4000 \times 10^6$  celler/L hade tidigare gjorts på Klinisk kemiska laboratoriet, UDS. Ett hundra celler räknades då manuellt på Giemsa-färgade preparat i ljusmikroskop.

Även differentialräkningen på de fem proverna från artroskopihästar utfördes på Giemsa-färgade preparat i ljusmikroskop. Cellerna delades in i neutrofiler, lymfocyter och stora mononukleära celler. Ett hundra celler räknades två gånger och ett medelvärde på dessa värden användes. I två prover fanns det väldigt få celler varför endast femtio celler räknades två gånger för att sedan använda ett medelvärde från dessa beräkningar.

Räkning av CD163-positiva celler utfördes i ljusmikroskop på sju cytopspinpreparat infärgade med CD163-antikroppen från R&D Systems. Cellerna klassificerades med hjälp av subjektiv bedömning som CD163-positiva eller icke CD163-positiva, beroende på om de visade infärgning eller inte med CD163-antikroppen. Ett hundra celler räknades fyra gånger i varje preparat. Medelvärde av de två medelvärden som erhöles av första och andra räkningen respektive tredje och fjärde räkningen beräknades. I två prov fanns det väldigt få celler varför endast 50 celler räknades tre gånger och sedan användes ett medelvärde för de tre cellräkningarna.

Antalet CD163-positiva celler jämfördes med totalantalet leukocyter och totalantalet stora mononukleära celler för att få fram andelen CD163-positiva celler i ledvätskan.

## **RESULTAT**

De sex ingående hästarna i studien var fördelade på en varmblodstravare och fem svenska halvblodhästar varav två ston, tre valacker och en hingst. Åldersfördelningen på hästarna var mellan 1 och 17 år.

Av de sju ledvätskeprover som ingick i studien var det endast två som graderats av kirurgen enligt det framtagna protokollet.

### **Detektion av CD163-positiva celler med hjälp av antikropp från Santa Cruz**

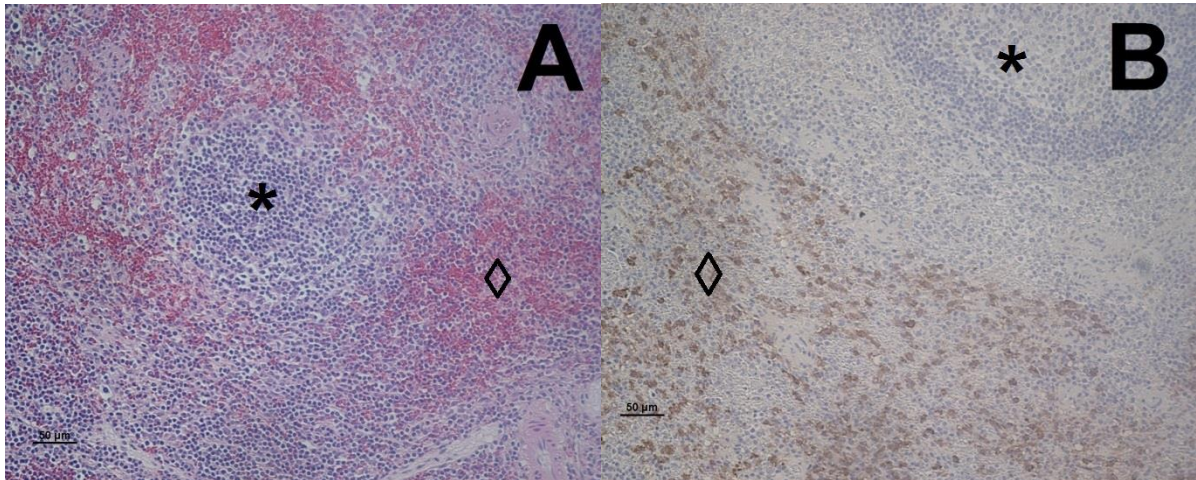
Då get anti-human CD163 antikroppen från Santa Cruz användes på metanolfixerade mjältutstryk och framkallning utfördes med hjälp av DAB-lösning från Santa Cruz framkallningskit kunde inga positiva celler identifieras i preparaten, oavsett koncentration och förbehandling. Inte heller vid immunohistokemi av vävnadspreparat från mjälte och ledkapsel kunde infärgning ses. DAB-lösningen fällde ut innan framkallning påbörjats.

Då preparaten framkallades med DAB från Dako REAL™ erhöles ospecifik infärgning av celler och extracellulärt matrix. För negativt resultat av preparat behandlade med get IgG (negativ kontroll) krävdes låga koncentrationer ( $0.4 - 0.004 \mu\text{g/ml}$ ) och vid dessa låga koncentrationer erhöles endast en ospecifik svag infärgning på preparat behandlade med primärantikroppen.

## Detektion av CD163-positiva celler med hjälp av antikropp från R&D Systems

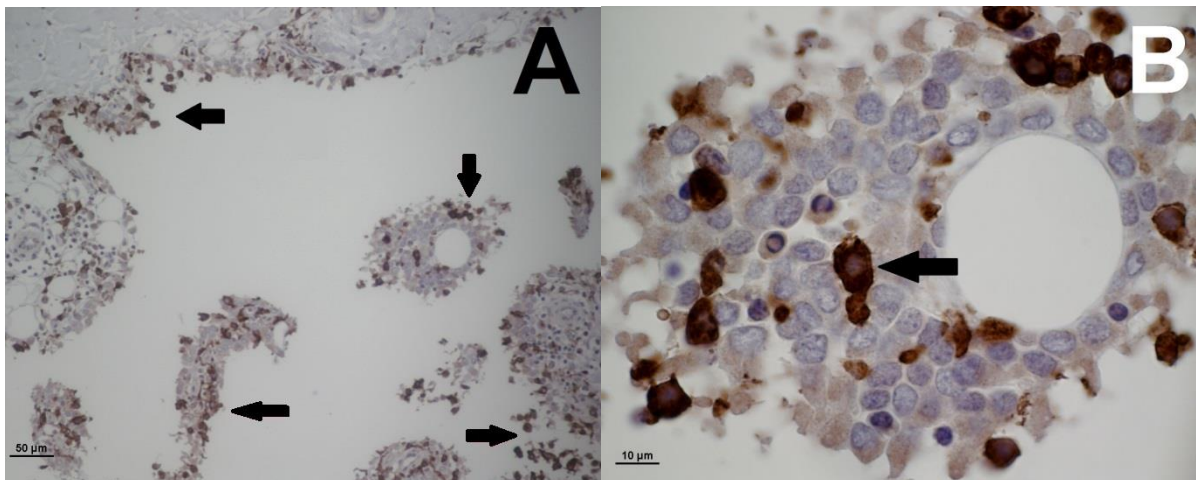
Då get anti-human CD163-antikroppen från R&D Systems användes på snitt från ledkapsel och mjälte kunde en tydlig infärgning av celler ses.

Vid immunohistokemi av formalinfixerad mjälte kunde CD163-positiva celler ses lokaliserade i den röda pulpan belägen utanför den vita pulpan med lymfocytansamlingar (figur 4).



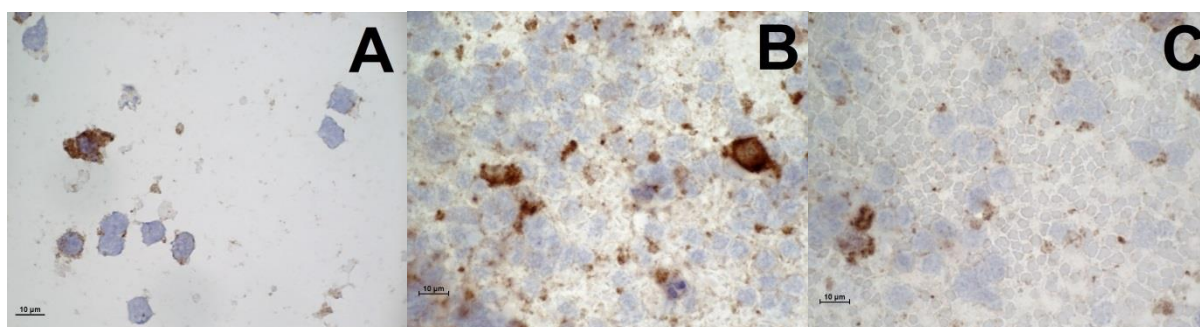
Figur 4. Mjältpreparat, 200x förstoring. (A) Haematoxylin och eosin-färgat histologiskt mjältpreparat. (B) Immunohistokemiskt infärgat histologiskt mjältpreparat (CD163-antikropp från R&D Systems, koncentration 0.5 µg/ml). CD163-positiva celler infärgade i brunt ses i den röda pulpan. \* = vit pulpa, ◇ = röd pulpa.

I ledkapseln var CD163-positiva celler i huvudsak lokaliserade till synovialmembranets intima (figur 5) och rikligt med CD163-positiva celler kunde ses i synovialmembranets villi.



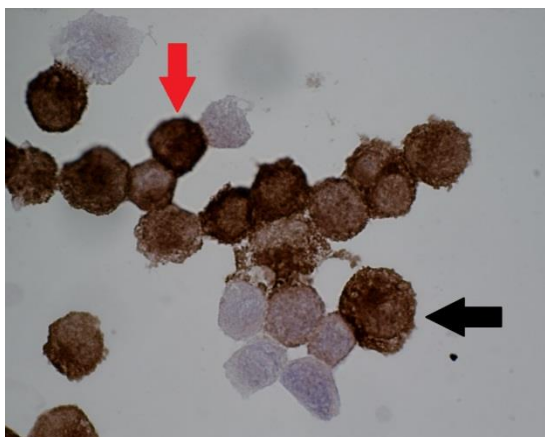
Figur 5. Ledkapselpreparat (A) 200x förstoring och (B) 1000x förstoring (med olja). Preparaten är immunohistokemiskt infärgade med CD163-antikroppen från R&D Systems (koncentrationen 0.5 µg/ml). CD163-positiva celler infärgade i brunt. Svarta pilar visar på CD163-positiva celler i synovialmembranets intima.

Då immunocyto kemi utfördes på mjältutstryk för att fastställa önskvärd koncentration, förbehandling och fixeringsmetod erhöles önskad skärpa på infärgning och tydliga cellkanter då preparaten fixerats i 1 % formalinlösning, förbehandlats i 95°C vattenbad med Diva Decloaker och antikropps-koncentration som användes var 0.25 µg/ml. Då preparaten inte förbehandlades erhöles en gråbakgrunds-färgning i samtliga cellers cytoplasma. Infärgning erhöles vid samtliga fixeringsmetoder, dock med varierande kvalitet. Fixering med metanol och aceton medförde indistinkta cellkanter, vilket försvårade urskiljningen av cellgränser (figur 6).



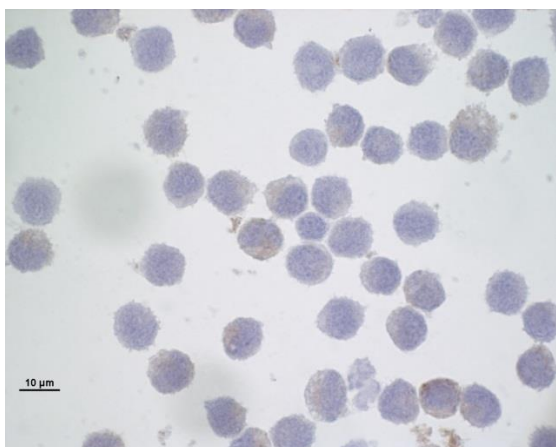
Figur 6. Mjältutstryk i 1000x förstoring (med olja). (A) Preparat fixerade i formalin med distinkta cellkanter. Indistinkta cellgränser erhöles på preparat fixerade i aceton (B) samt preparat fixerade i metanol (C). Preparaten är immunocyto kemiskt infärgat med CD163-antikropp från R&D Systems (koncentrationen 0.25 µg/ml).

1 % formalin och 95°C vattenbad med Diva Decloaker som var den fixeringsmetod respektive förbehandling som gett de mest tillfredställande resultaten användes på ledvätskepreparaten. Av de fem koncentrationer av primärantikropp som användes gav 0.25 µg/ml den mest tillfredställande infärgningen. Vid denna koncentration färgades endast celler morfologiskt förenliga med stora mononukleära celler in. Infärgningen var distinkt och cellkärnan kunde skönjas hos cellerna (figur 7). De CD163-positiva cellerna uppvisade något varierande storlek och var olika starkt infärgade. De mindre cellerna tenderade att vara kraftigare infärgade (mörkare) än de större cellerna. Högre koncentrationer gav en så stark infärgning att cellkärnor inte kunde urskiljas i de positiva cellerna. Den lägre koncentrationen (0.1 µg/ml) gav en svag infärgning av celler (figur 8) vilket medförde att cellkärnan var väldigt lätt att urskilja, men skillnaden på positiva och negativa celler för CD163 uttrycket var inte lika påtaglig.



Figur 7. Cytospinpreparat från ledvätska i 1000x förstoring (med olja). Preparatet är immunocytochemisk infärgat med CD163-antikropp från R&D Systems (koncentration 0.25 µg/ml). CD163-positiva celler har ett distinkt infärgat cellmembran i brunt. I preparatet ses starkare (röd pil) eller svagare (svart pil) infärgade celler

Vid en koncentration på 0.1 µg/ml blev infärgningen svag och inte lika distinkt som då koncentrationen 0.25 µg/ml användes (figur 8).



Figur 8. Cytospinpreparat från ledvätska i 1000x förstoring (med olja) av CD163-positiva celler. Preparatet är immunocytochemisk infärgat med CD163-antikropp från R&D Systems (koncentrationen 0.1 µg/ml). CD163-positiva celler har svagt infärgat cellmembran i brunt.

## Celltal i ledvätska

Proverna hade en stor variation i totalantalet leukocyter då det högsta värdet var  $5120 \times 10^6$  celler/L och det lägsta var  $210 \times 10^6$  celler/L. Även andelen CD163-positiva celler varierade påtagligt mellan proverna, då den högsta andelen CD163-positiva celler som räknades var 78 % och den lägsta andelen var 26 % (tabell 7).

I tabell 8 redovisas resultaten från differentialräkning av ledvätskans leukocyter och andelen CD163-positiva celler i ledvätskan från samtliga sju ledvätskeprover. Andelen neutrofiler varierade mellan 0 och 11 % och andelen lymfocyter varierade mellan 3 och 29 %. Andelen stora mononukleära celler varierade mellan 70 % och 94 % beroende på prov. Av de stora mononukleära cellerna i ledvätskeproverna



varierade frekvensen CD163-positiva celler mellan 29 % och 85 %. Inget tydligt samband kunde ses mellan förekomsten av CD163-positiva celler i förhållande till totalantalet leukocyter (figur 9) och inte heller mellan antalet stora mononukleära celler och andelen CD163-positiva celler (figur 10).

Tabell 7. Sammanställning av ledvätskeparametrar samt typ och grad av leddkada.

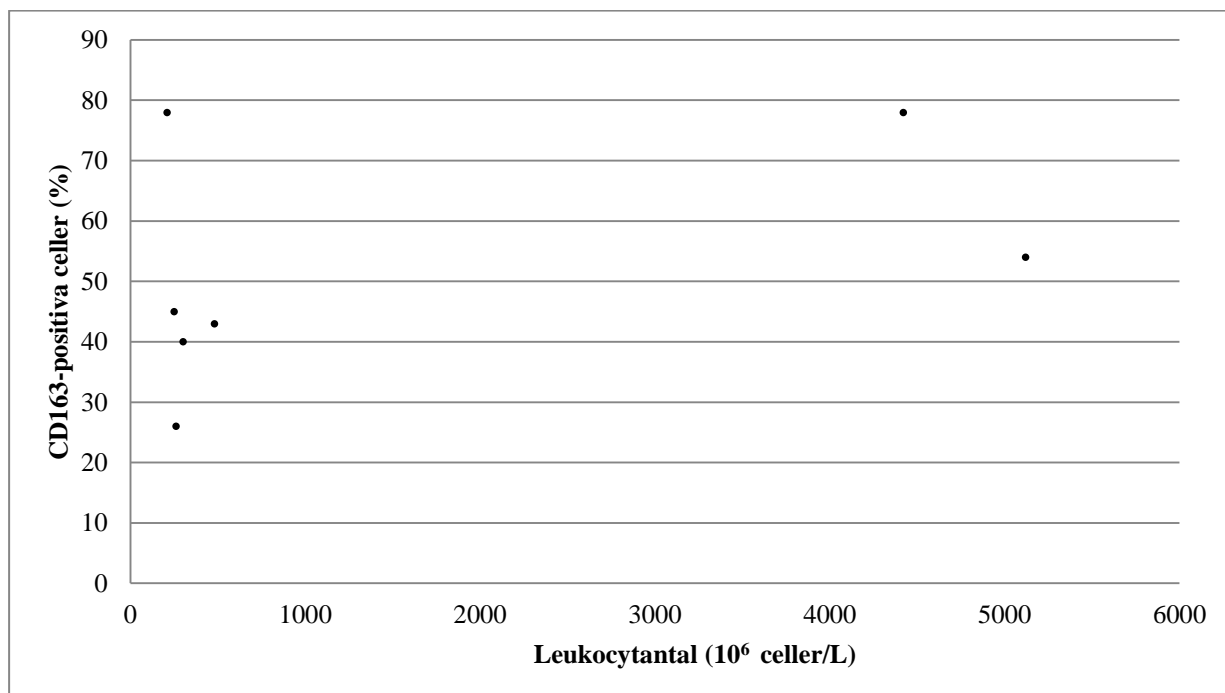
Häst	Diagnos	Ledvätska		Typ av leddkada med gradering		
		Antal leukocyter (10 <sup>6</sup> celler/L)	Andel CD163- positiva celler (%)	Synovit	Kotled erosion	Kotled slipfårar
1*	Sår**	4420	78	-	-	-
2*	Sår**	5120	54	-	-	-
3#	DOF	260	26	2	1	3
4#	OA	480	43	2	0	0
5#	DOF	210	78	-	-	-
6#	POF	250	45	-	-	-
7#	POF	300	40	-	-	-

\* = prover från Klinisk kemiska laboratoriet, UDS, \*\* = ledvätska från häst med lednära sårskada vid kotled, # = prover från artroskopi, - = ej graderad, DOF = dorsalt osteokondralt fragment, POF = palmart osteokondralt fragment

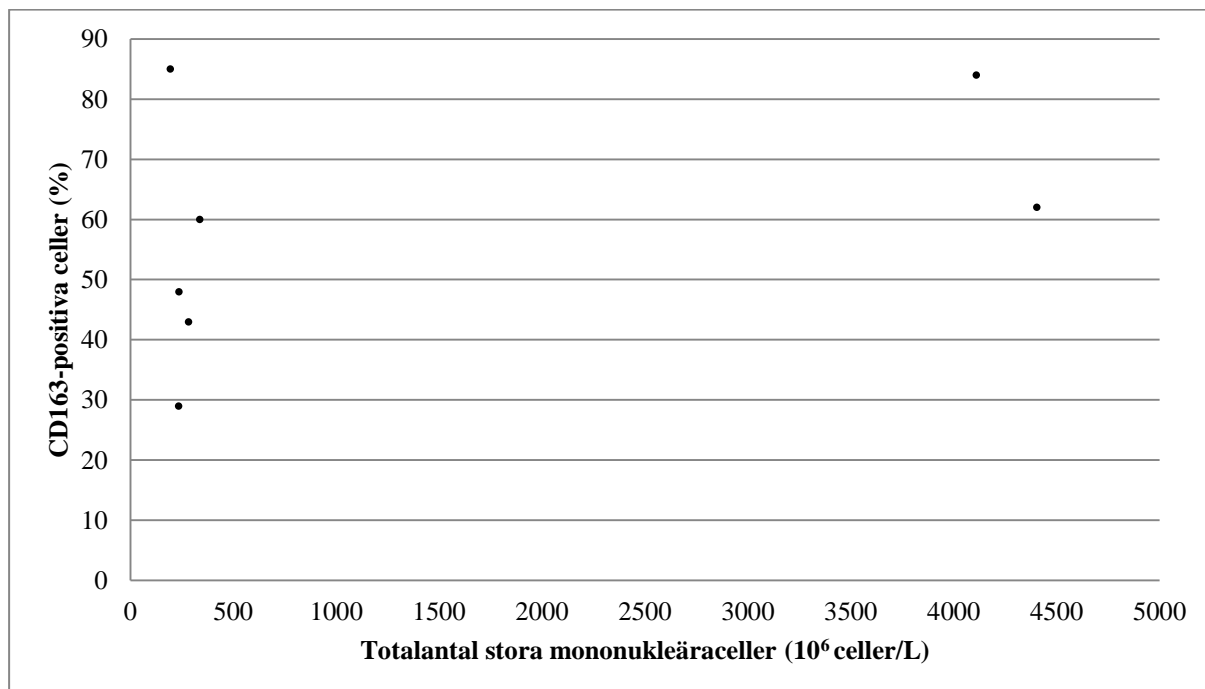
Tabell 8. Differentialberäkning på ledvätska samt av andel CD163-positiva celler.

Häst	Leukocytantal (10 <sup>6</sup> celler/L)	Neutrofiler (%)	Lymfocyter (%)	Stora mononukleära (%)	Andel CD163-positiva celler av leukocyter (%)	Andel CD163-positiva celler av stora mononukleära (%)
1*	4420	1	6	93	78	84
2*	5120	11	3	86	54	62
3#	260	3	7	90	26	29
4#	480	1	29	70	43	60
5#	210	5	3	92	78	85
6#	250	0	6	94	45	48
7#	300	0	6	94	40	43

\* = preparat med mer än 4000 x10<sup>6</sup> celler/L, # = preparat från artroskopimaterial



Figur 9. Andelen CD163-positiva celler av leukocytantalet i ledvätska.



Figur 10. Andelen CD163-positiva celler av totalantalet stora mononukleära celler i ledvätska.

## DISKUSSION

Syftet med arbetet var att utveckla en metod för att undersöka förekomsten av CD163-positiva celler i ledvätska från häst med hjälp av immunocytokemi. Förhoppningen är att med hjälp av en sådan metod kunna detektera CD163-positiva celler i ledvätska från häst och i förlängningen kunna undersöka om det finns en korrelation mellan antalet CD163-positiva makrofager samt typ och grad av ledskada.

I arbetet testades två olika polyklonala antikroppar riktade mot humant CD163, en antikropp från Santa Cruz och en från R&D Systems. Detektion av CD163-positiva celler (M2 makrofager) med hjälp av antikropp och framkallningskit från Santa Cruz var inte möjlig. Detta kan bero på att antikroppen som användes i studien inte var specifikt riktad mot CD163 hos ekvina makrofager utan riktad mot humant CD163. CD163 molekylen hos människa har flera isoformer och överensstämmelsen mellan hästens CD163 och humana isoformer av CD163 anges till 84 % (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Det är också möjligt att antikroppen inte kan binda till gemensamma epitoper på grund av olika proteinkonformation hos humant och ekvint CD163.

Antikroppen från Santa Cruz gav ingen infärgning vid framkallning med DAB inkluderat i Santa Cruz framkallningskit. När DAB från Dako REAL<sup>TM</sup> användes sågs en ospecifik infärgning på både preparat som inkuberats med Santa Cruz CD163-antikropp och preparat som inkuberats med IgG (negativ kontroll). Detta kan till exempel bero på att den primära antikroppen varit defekt vid leverans och därför inte fungerat. Det kan också bero på att DAB från Santa Cruz framkallningskit inte fungerat som den skulle, då det uppstod en fällning i framkallningslösningen innan den applicerats på preparaten. Enligt kommunikation med Santa Cruz var denna fällning dock helt normalt. Den ospecifika infärgning som detekterades efter användning av DAB från Dako skulle kunna bero på en otillräcklig blockering av endogena peroxidaser då HRP även kan påträffas i vävnader så som blodkärlens endotel, erythrocyter, muskler och monocyter i form av endogent peroxidase (Pace, 2009). Om det endogena peroxidaset är tillräckligt likt det enzym som används för framkallning kan detta ge falskt positiva färgutfällningar eller interferera med det tillsatta enzymet.

Detektionsmetoden av M2 makrofager i ledvätska, ledkapsel och mjältutstryk med hjälp av den polyklonala antikroppen från R&D Systems och framkallningskit från Vectastain fungerade tillfredställande. Att celler kunde detekteras tyder på att det fanns tillräckligt många exponerade gemensamma epitoper mellan humant och ekvint CD163 för att en human primärantikropp ska kunna binda till ekvint CD163.

Koncentrationen 0.25 µg/ml gav den mest tillfredställande infärgningen. Detta eftersom inmärkningsen var distinkt och cellkärnan kunde skönjas hos cellerna. Den starka infärgningen som erhöles då högre koncentrationer testades gav en så stark infärgning att cellkärnor inte kunde urskiljas i de positiva cellerna. Då cellkärnan inte kan urskiljas kan man inte med absolut säkerhet påstå att det är en stor mononukleär



cell som blivit inmärkt, därför är högre koncentrationer inte fördelaktigt. Den lägre koncentrationen som testades (0.1 µg/ml) gav en svag inmärkning av celler vilket medförde att cellkärnan var väldigt lätt att urskilja, men skillnaden på positiva och negativa celler för CD163-uttrycket var inte lika påtaglig, vilket gjorde cellräkningen av positiva celler osäker.

För att få fram ett optimalt protokoll testades olika fixeringsmetoder. Av dessa gav 1 % formalin den mest tillfredställande fixeringen. Formalinfixering är en så kallad "cross-link" fixering vilket innebär att det uppstår korsbindningar inom proteiner och nukleinsyror (Ramos-Vara *et al.*, 2008). På detta vis bevaras lipider, nukleinsyror och andra makromolekyler i preparatet. Formalinfixering skapar metylen-bryggor mellan fria aminosyror och andra protein vilket kan resultera i strukturella förändringar som kan modifiera epitopen som antikroppen ska binda till. Preparat fixerade med formalin uppvisade tydliga celler med bra detaljskärpa vid mikroskopering. Preparaten fixerade i metanol respektive aceton, som båda klassas som koagulativa fixeringsmetoder, gav suddiga indistinkta celler och fransig utlinjering av cellgränserna. Koagulativa fixeringsmedel verkar genom att koagulera proteiner och på så vis göra dem olösliga. Detta sker genom att fritt vatten ersätts av fixeringsmedlet. Därmed uppstår hydrofila och hydrofoba bindningar och under denna process sker en viss "uppveckning" av proteinstrukturer i preparatet (Ramos-Vara, 2005). Koagulativ fixering anses bibehålla vävnadsstrukturer bra för ljusmikroskopi men får cytoplasman att klumpa ihop sig och ger en dålig bevaring av sekretoriska granula och mitokondrier.

Vidare undersöktes effekten av "antigen retrieval" på preparaten. Metoderna som användes var 95°C vattenbad med Diva Decloaker respektive citratbuffert, vilka båda är så kallade HIER-lösningar. Förbehandling med citratbuffert gav en bra infärgning men inte lika tydlig som då förbehandling gjorts med Diva Decloaker. Den sistnämnda gav en distinkt inmärkning av celler även vid låga koncentrationer. Preparat som inte förbehandlats fick en diffus gråaktig färgförändring i samtliga cellers cytoplasma och antigen kunde inte detekteras i koncentrationen 0.1 µg/ml. Resultaten visade att med hjälp av "antigen retrieval" kunde en lägre koncentration av antikroppen användas för detektion av CD163-positiva celler.

Antikroppens specificitet för makrofager utvärderades med hjälp av infärgning på mjältpreparat. Med avseende på lokaliseringen av CD163-positiva celler i mjältsvävnaden stämmer detta överens med var makrofager normalt kan påvisas, dvs. perifert om den vita pulpan (Kierszenbaum, 2007). Vid immunohistokemi utfört på ledkapselvävnad sågs CD163-positiva celler huvudsakligen i synovialmembranets intima. Denna lokalisation stämmer bra överens med den beskrivning som tidigare studier har gjort avseende makrofagernas lokalisation i ledkapseln på häst (Johansson & Rejno, 1976). Detta stärker att det är M2 makrofager i synovialmembranet som har färgats in. Ett fåtal CD163-positiva celler var lokaliserade längre in i vävnaden kring blodkärl. Med tanke på lokaliseringen skulle

dessas celler kunna utgöras av makrofager som rekryterats i form av monocytter från blodet och differentierat ut till makrofager i vävnaden.

De två ledvätskeproverna från Klinisk kemiska laboratoriet, UDS, var speciellt utvalda för experimentet på grund av att de hade ett högt antal totala leukocyter ( $>4000 \times 10^6$  celler/L) och ett högt antal stora mononukleära celler. Detta för att ett högt antal stora mononukleära celler teoretiskt sett skulle öka sannolikheten att kunna påvisa CD163-positiva celler i preparaten.

I ledvätskepreparaten infärgades endast stora mononukleära celler in av CD163-antikroppen. Olika starkt infärgade celler kunde ses vid samma antikroppskoncentration. Stora infärgade celler tenderade att uppvisa svagare infärgning än små infärgade celler. Detta kan vara relaterat till skillnader i koncentrationen av CD163 molekyler på cellernas yta. Det är känt att CD163 uttrycket uppregleras på M2 makrofager då de aktiveras (Hogger *et al.*, 1998; Philippidis *et al.*, 2004), och det är därför möjligt att skillnaden i färgintensitet kan bero på att en del av de infärgade cellerna är mer aktiverade än andra. Det skulle även kunna vara så att de svagare infärgade cellerna nyligen har fagocyterat varpå deras cellmembran har expanderat vilket medfört att samma antal receptorer har blivit fördelade på en större yta.

Av de stora mononukleära cellerna i ledvätskeproverna var frekvensen CD163-positiva celler 29-85%. Dessa celler är sannolikt är M2 makrofager. Resterande stora mononukleära celler skulle kunna vara M1 makrofager eller monocytter som ännu inte differentierat ut till en bestämd makrofagfenotyp.

Det är möjligt att antalet CD163-positiva celler i ledvätska kan användas som biomarkör för olika typer av leddskada, inklusive OA. Emellertid saknades i detta arbete undersökning av förekomst av CD163-positiva celler från friska leder, vilket begränsar tolkningen av fynden. Även det låga provantalet medförde att resultaten inte kunde tolkas avseende CD163-positiva cellers potentiella värde som biomarkör. Det fanns en stor andel CD163-positiva celler i ledvätskan från leden med dorsalt osteokondralt fragment (DOF) och från en led med ett lednära sår utan kännedom om leddskada. Uppkomsten av både proximalt osteokondralt fragment (POF) och DOF anses vara frakturer uppkomna på grund av mekanisk belastning på kotleden under följens första levnadsår orsakad av att bakbenets axel roterar utåt (Dalin *et al.*, 1993). En annan orsak till att dessa fragment uppstår skulle kunna vara en medfödd försvagning i benet vilket gör att benet inte klarar av belastningen den utsätts för, denna patogenes skulle innebära att POF och DOF ingår i OA-komplexet (Dalin *et al.*, 1996; Pool, 1996). Fragmenten kan även uppstå då kronisk vävnadsskada, som till exempel OA, gett upphov till osteofytbildningar som sedan fraktureras (Pool & Meagher, 1990). Det är möjligt att det höga antalet CD163-positiva celler är relaterat till ett reparativt svar i leden.

Provet med den lägsta andelen CD163-positiva celler (26 %) kom från en led med DOF. Denna led uppvisade slipfårar av grad 3, en broskerosion  $<5$  mm i diameter

och måttlig synovit. Enligt journalnoteringar hade hästen varit symtomfri och DOF upptäckts under en rutinröntgen före start. Det är möjligt att det akuta skedet i leden är passerat och både leukocytantalet och antalet CD163-positiva celler har nedreglerats. Det förhållande vis låga antalet CD163-positiva celler skulle också kunna vara relaterat till den måttliga synoviten varför det finns förhållandevis större antal M1 makrofager i jämförelse med M2 makrofager. Kring detta kan endast spekuleras då ingen sjukdomshistoria finns och då få hästar ingick i studien för att kunna jämföra med liknande individer.

De övriga fyra proverna hade medelhög andel CD163-positiva celler (45, 40, 43 respektive 54 % av totalantalet leukocyter). Två av proverna var från leder diagnostiserade med POF, ett prov från en led med OA och ett prov från en häst med sårskada över kotleden. Leden med OA hade måttlig synovit utan övriga ledförändringar, de övriga tre lederna var inte graderade avseende förändringar. Inom denna grupp varierade totalantalet leukocyter kraftigt men andelen CD163-positiva celler i förhållande till totalantalet leukocyter uppvisade liten variation.

Ytterliggare forskning behövs för att fastställa om en statistiskt relevant korrelation föreligger mellan andel CD163-positiva celler i ledvätska samt typ och grad av ledförändringar. Det vore även önskvärt att inkludera koncentrationer av CD163 i blod och korrelera detta till förekomsten av CD163-positiva celler i ledvätska. Om en sådan korrelation föreligger kan analys av systemisk förekomst av CD163 utgöra en del av en rutinundersökning av hästar med hältproblem.

Följande begränsningar i detta examensarbete bör uppmärksammas.

Eftersom alla undersökta prover kom från hästar med någon grad av ledskada kan resultaten ej relateras till förekomst av CD163-positiva celler i friska leder.

Då studien planerades var förhoppningen att ett tjugotal ledvätskeprover skulle analyseras. Beroende på bristande patienttillgång och ofullständigt ifyllda graderingsprotokoll kom undersökningsmaterialet att kraftigt begränsas. I studien analyserades endast fem ledvätskeprover från artroskoperade leder, vilket omöjliggjorde statistiska beräkningar.

Två av de prover som analyserats hade lindriga ledförändringar och lågt total antal leukocyter i ledvätska. Prover med låga antal celler försvårade specificiteten på cellräkningen eftersom den standardiserade cellräkningsmetoden inte kunde tillämpas då det inte fanns tillräckligt många celler att räkna. Om cellerna inte kan räknas i samma antal på alla prover blir inte differentialräkningen och cellräkningen av andelen CD163-positiva celler helt likvärdig.

## KONKLUSION

I denna studie utarbetades en metod för att påvisa CD163-positiva celler med hjälp av immunocytokemi på ledvätska från häst. Utvärdering av immunohistokemisk infärgning utfördes även på mjält- och ledkapselpreparat, vilka båda uppvisade

positivt inmärkt celler som baserat på sitt utseende och lokalisation tolkades som makrofager. Den framtagna metoden möjliggör fortsatta studier på ledvätska för undersökning av förekomst av denna typ av celler vid olika typer av ledsador, och utvärdering av desamma som biomarkör för OA hos häst. För att undersöka om det finns någon korrelation mellan graden av ledskada och antal CD163-positiva celler krävs ytterligare studier med en större studiepopulation.

## **TACK**

Tack Jenny Wetzell för konstant tillgänglighet och all hjälp med provinsamlingen. Tack även till all den övriga personalen på Mälaren Hästklinik för all hjälp. Tack till Maria Löfgren för all hjälp och undervisningen om rutinerna i laboratoriet. Tack Erica Örténstedt för all hjälpen med provhantering, provtransportering och bilutlåning. Tack till Christina Nilsson och Agneta Boström på BVFs laboratorium för montering av preparaten, allt stöd, fantastiskt trevligt sällskap och er expertis. Tack till Tamás Toth på UDS för engagemanget, trots att det inte blev några prover. Tack Inger Lilliehöök för repetitionen i cellräkning och för all hjälp i samband med ledvätskehanteringen. Tack även till övrig personal på klinisk kemiska laboratoriet för ett glatt bemötande, för alla prover ni fick ta emot lite för sent och för all hjälp med cytospinpreparaten. Tack till Stina Ekman för synpunkter och kommentarer. Framförallt ett jättestort tack till Cecilia Ley för allt tålamod, engagemang och alla idéer.

## REFERENSER

- Ambarus, C. A., Baeten D. LP., de Hair, M. JH., Noordenbos, T. & Tak, PP. (2012). Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display an IL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis. *Arthritis Research & Therapy* 2012, 14:R74.
- Atkinson, A.J., Colburn, W.A., DeGruttola, V.G., DeMets, D.L., Downing, G.J., Hoth, D.F., Oates, J.A., Peck, C.C., Schooley, R.T., Spilker, B.A., Woodcock, J. & Zeger, S.L. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69(3), 89-95.
- Benito, M.J., Veale, D.J., Fitzgerald, O., van den Berg, W.B. & Bresnihan, B. (2005). Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Disease* 64, 1263-1267.
- Bertone, A. (2004). Distal limb: fetlock and pastern. HINCHCLIFF, K.; KANEPS, A.; GEOR, RJ *Equine sports medicine and surgery: basic and clinical sciences of equine athlete*. St Louis, Mo: Saunders.
- Bijlsma, JW., Berenbaum, F. & Lafeber, FP. (2011). Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 377, 2115-2126.
- BLAST, the basic local alignment search tool (2016-02-04). *BLAST assembled genomes*. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [2015-12-10]
- Boenisch T. (2006). Heat-induced antigen retrieval: what are we retrieving? *J Histochem Cytochem* 54:961-964.
- Boenisch T. (2009). Chapter 3: Basic Enzymology. I: Kumar G. & Rudbeck L. (red.) *Immunohistochemical (IHC) staining methods*. 5. ed. California: Dako North America, 15-19.
- Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, & Hughes CE.(2005). The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R187.
- Buckland-Wright, C. (2004). Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 10-19.
- Buechler, C., Ritter, M., Orso, E., Langmann, T., Klucken, J. & Schmitz, G. (2000) Regulation of scavenger receptor CD163 expressions in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 2000, 67:97-103.
- Burr, DB. & Schaffler, MB. (1997). The involvement of subchondral mineralized tissue in osteoarthritis: quantitative microscopic evidence. *Microsc Res Tech* 37:343-357.
- Caron, J.P. (2005). Intra-articular injections for joint disease in horses. *Vet clin North Am Equine Pract* 21,559-573.
- Caron, J.P. (2011). Chapter 61: Osteoarthritis. I: Ross, M.W., et al. (red.) *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse* 2. Ed. Saint Louis: W.B. Saunders, 655-668
- Copelan, R. & Bramlage, L. (1983). Surgery of the fetlock joint [of the horse]. *The veterinary clinics of North America* 5.
- Cruz, A.M. & Hurtig, M.B. (2008). Multiple pathways to Osteoarthritis and articular fractures: is subchondral bone the culprit? *Vet Clin North Am Equine Pract* 24(1), 101-16.
- Daghestani, H.N., Pieper, C.F. & Kraus, V.B.(2015). Soluble Macrophage Biomarkers Indicate Inflammatory Phenotypes in Patients With Knee Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology* 67(4): 956-965.
- Dalin, G., Sandgren, B. & Carlsten, J. (1993). Plantar osteochondral fragments in the metatarsophalangeal joints in Standardbred trotters; result of osteochondrosis or trauma?. *Equine vet. J., Suppl.* 16: 62-65.
- Dyce, K.M., Sack, W.O. & Wensing, C.J.G. (2010). *Textbook of veterinary anatomy*. 4. Ed. China: Saunders.
- Edin, S., Dahlin, A. M., Oldenborg, P-A., Palmqvist, R., Rutegård, J., Wikberg, M.L. & Öberg, Å. (2012). The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. *PLoS ONE* 7(10): e47045.

- Egenvall, A., Penell, J.C., Bonnett, B.N., Olson, P. & Pringle, J. (2005). Morbidity of swedish horses insured for veterinary care between 1997 and 2000: variations with age, sex, breed and location. *Veterinary Record* 157:436-443.
- Egenvall, A., Penell, J.C., Bonnett, B.N., Olson, P. & Pringle, J. (2006). Mortality of swedish horses with complete life insurance between 1997 and 2000: variations with sex, age, breed and diagnosis. *Veterinary Records* 158:397-406.
- Fahy, N., de Vries-van Melle, M.L., Lehmann, J., Wei, W., Grotenhuis, N., Farrell, E., van der Kraan, P.M., Murphy, J.M., Bastiaansen-Jenniskens, Y.M. & van Osch, G.J.V.M. (2014). Human osteoarthritic synovium impacts chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via macrophage polarisation state. *Osteoarthritis and Cartilage* 22: 1167-1175.
- Farahat, MN., Yanni, G., Poston, R. & Panayi, GS. (1993). Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 52:870-875.
- Gao, Y., Liu, S., Huang, J., Guo, W., Chen, J. & Zhang, L. (2014). The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes. *Biomed Res Int.* 2014:648459. doi:10.1155/2014/648459.
- Goldring, M.B. & Goldring, S.R. (2007). Osteoarthritis. *Journal of cellular physiology* 213:626-634.
- Henderson, B. & Pettipher, E.R. (1985). The synovial lining cell: biology and pathophysiology. *Sem. Arth. Rheum.* 15, 1-32.
- Herzog, W. & Federico, S. (2006). Considerations on joint and articular cartilage mechanics. *Biomech Mod Mechanobiol* 2006;5:64-81.
- Iwanaga, T., Shikichi, M., Kitmura, H., Yanase, H. & Nozawa-Inoue, K. (2000). Morphology and functional roles of synovocytes in the joint. *Archives of Histology and Cytology* 63, 17-31.
- Johansson, H.E. & Rejmo, S. (1976). Light and electron microscopic investigation of equine synovial membrane. *Acta vet. Scand* 17, 153-168.
- Kawcak, CE., McIlwraith CW., Norrdin, RW., Park, RD. & Steyn PS. (2000). Clinical effects of exercise on subchondral bone and metacarpophalangeal joints in horses. *Am J Vet Res* 2000;61:1252-1258
- Kierszenbaum, A.L. (2007). *Histology and cell biology: an introduction to pathology*. 2. ed. Philadelphia: Mosby, Inc.
- Kraus, VB., Burnett, B., Coindreau, J., Cottrell, S., Eyre, D., Gendreau, M., Gardiner, J., Garner, P., Hardin, J., Henrotin, Y., Heinegård, D., Ko, A., Lohmander, S., Matthews, G., Menetski, J., Moskowitz, R., Persiani, S., Poole, R., Rousseau, JC. & Todman, M. (2011). Application of biomarkers in the development of drugs intended for the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 19(5), 515-542.
- Kumar, G.L., Rudbeck, L., Boenisch, T., Taylor, Farmilo, A.J., Stead, R.H., Happel, J.F., Saxena, R. & Key, M. (2009). *Education Guide: immunochemical (ICH) staining methods*. California: Dako North America.
- Lacourt, M., Gao, C., Li, A., Girard, C., Beauchamp, G., Henderson, J.E. & Laverty, S. (2012). *Osteoarthritis and Cartilage* 20:572-583.
- Lane, LB., Villacin, A. & Bullough, PG. (1997). The vascularity and remodeling of subchondral bone and calcified cartilage in adult human femoral and humeral heads. An age- and stress-related phenomenon. *J Bone Joint Surg Br* 59:272-278.
- Loeser, R.F., Goldring, S.R., Goldring, M.B. & Scanzello, C.R. (2012). Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis & Rheumatology* 64(6), 1697-1707.
- Lopa, S., Leijts, M.J.C., Moretti, M., Lubberts, E., van Osch, G.J.V.M. & Bastiaansen-Jenniskens, Y.M. (2015). Arthritic and non-arthritic synovial fluids modulate IL10 and IL1RA gene expression in differentially activated primary human monocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 23 (2015) 1853-1857.
- McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., Fuller, C.J., Hurtig, M. & Cruz, A. (2010). The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthritis Cartilage* 18 Suppl 3, S93-105.
- Martel-Pelletier, J., Alaaeddine, N. & Pelletier, J.P. (1999). Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Frontiers and Bioscience* 4, D694-D703.

- Matsubara, T., Spycher, M.A., Ruttner, J.R. & Fehr, K. (1983). The ultrastructural localization of fibronectin in the lining layer of rheumatoid arthritis synovium: the synthesis of fibronectin by type B lining cells. *Rheumatology International* 3, 75-79.
- Mobasheri, A. (2012). Osteoarthritis year 2012 in review: biomarkers. *Osteoarthritis and Cartilage* 20(2012) 1451-14.
- Moghaddami, M., Cleland, L.G. & Mayrhofer, G. (2004). MHC II<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> cells from synovium-rich tissues of normal rats: phenotype, comparison with macrophage and dendritic cells lineages and differentiation into mature dendritic cells in vitro. *International immunology*, Vol. 17(8), 1103-1115.
- Mosser, D.M. & Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8 (12) 958-969.
- Oehler, S., Neureiter, D., Meyer-Scholten, C. & Aigner, T. (2002) Subtyping of osteoarthritis synoviopathy. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:633-640.
- Pace E.G. (2009). Chapter 16: Optimization of immunohistochemical. I: Kumar G. & Rudbeck L. (red) *Immunohistochemical (IHC) staining methods*. 5. ed. California: Dako North America, 109-114.
- Palmer, J.L. & Bertone, A.L. (1994). Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. *Equine vet. J.* 26(4), 263-277.
- Penell, J., Egenvall, A., Bonett, B., Olson, P. & Pringle, P. (2005). Specific courses of morbidity among Swedish horses insured for veterinary care between 1997 and 2000. *The Veterinary Record*, vol. 157, ss. 470-477.
- Pool, R.R. (1996). Pathologic manifestation of joint disease in the athletic horse. I: McIlwraith, C.W. & Trotter, G.W (red), *Joint disease in the horse*. Philadelphia: W.B. Saunders company, 87-104.
- Pool, R.R. & Meagher, D.M. (1990). Pathologic findings and pathogenesis of racetrack injuries. I: Turner, A.S. & Goodman, N.L. (red), *The veterinary clinics of North America: Equine practice*. vol. 6. Philadelphia: W.B. Saunders company, 1-30.
- Ramos-Vara, J.A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42:405-426.
- Ramos-Vara, J.A., Kiupel, M., Baszler, T., Bliven, L., Brodersen, B., Chelck, B., West, K., Czub, S., Del Piero, F., Dial, S., Ehrhart, E.J., Graham, T., Manning, L., Paulsen, D. & Valli, V.E. (2008). Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest* 20:393-413.
- Richardson, DW. & Dyson, S.J. (2011). Chapter 36 – The Metacarpophalangeal Joint. In: Ross, M.W., et al. (red). *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse (Second Edition)*. pp. 394-410. Saint Louis: W.B. Saunders. ISBN 978-1-4160-6069-7.
- Rousseau J.Ch. & Garnero, P. (2012). Biological markers in osteoarthritis. *Bone* 2012;51, 265-277
- Samuels, J., Krasnokutsky, S. & Abramson, SB. (2008). Osteoarthritis. A tale of three tissues. *Bull NYU Hosp Joint Dis* 2008;66:244-250.
- Scanzello, C.R. & Goldring, S. (2012). The role of synovitis in Osteoarthritis pathogenesis. *Bone* 51(2): 249-257.
- Sellam, J. & Berenbaum, F. (2010). The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:625-635.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176:287-292.
- Tizard, I.R. (2009). *Veterinary immunology an introduction*. 8. Ed. China: Saunders.
- van Weeren, R. (2013) Joint physiology: responses to exercise and training. In: Hinchcliff K.W., K.A.J.G.R.J. *Equine Sports Medicine and Surgery: Basic and clinical sciences of the equine athlete (second edition)*. pp. 213-222. China: Saunders.
- Zachary, J.F. & McGavin, M.D. (2012). *Pathologic basis of veterinary disease*. 5. Ed. China: Elsevier.